

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2001年5月10日(10.05.2001)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 01/32850 A1

(51) 国际分类号: C12N 11/08, C08B 37/08
(21) 国际申请号: PCT/CN99/00174
(22) 国际申请日: 1999年10月29日(29.10.1999)
(25) 申请语言: 中文
(26) 公布语言: 中文
(71)(72) 发明人/申请人: 胡敏(HU, Min) [CN/CN];
李劲伟(LI, Shaowei) [CN/CN]; 中国北京市海淀区
玉渊潭南路普惠北里6号楼11-02, Beijing (CN).
(74) 代理人: 中原信达知识产权代理有限责任公司
(CHINA SINDA INTELLECTUAL PROPERTY
LTD.); 中国北京市朝阳区建国路99号中服大厦
1300室, Beijing 100020 (CN).
(81) 指定国(国家): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES,

FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期
PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: SURFACE TREATMENT WITH POLYPEPTIDES TO IMPROVE FIBROBLAST ADHESION TO
HYALURONAN

(54) 发明名称: 用多肽化表面处理法改进成纤维素对透明质酸之黏附性

(57) Abstract: The present invention relates to hyaluronan (HyA), which are extracellular media, they have special chemical property to confer the cell adhesion and can promote cell growth. The limit a lot the use in the artificial biomaterial tissue engineering as they are soluble material in water. The present invention provides a new method to achieve bifunctions, one of which is to decrease HyA solubility by polypeptides, and the other is to promote cell adhesion through the effect of the cell surface adhesion molecular receptor, using a new method to treat surfaces using polypeptides to improve cell adhesion to HyA, HyA being first crosslinked by glutaraldehyde to strand forms, then being treated on the surfaces by polylysine, glycine or glutamate respectively. The modified HyA are incubated together with fibroblast in vitro for utility experiments. The cell adhesion and proliferation are assayed by histology and immunohistochemistry test. It is showed: (1) polylysine can remarkably improve fibroblast adhesion to HyA; (2) HyA can be crosslinked by glutaraldehyde so as to decrease biodegradation; (3) it is verified both in vivo and in vitro that the modified HyA have high biological MHC, they are new complex biomaterials which have potential use in industrial scale.

WO 01/32850 A1

[见续页]

(57) 摘要

透明质酸(HyA)是一种细胞外介质,有特殊化学特性能参与细胞的黏附和促进细胞的生长。由于它是水溶性物质,故在人工生物材料的组织工程学的应用上受到很大限制。本发明以达成以多肽具有降低HyA溶解性和通过细胞表面黏附分子受体的作用促进细胞黏附的双重作用,并使用一种使用多肽表面处理提高细胞黏附于HYA的新方法, HYA首先被戊二醛交联成线状,再分别经多聚赖氨酸、甘氨酸、或谷氨酸再表面化处理。修饰过的HYA与成纤维细胞体外共同孵育并作实用性实验。经由组织学和免疫组织化学方法检验细胞的黏附和增生。结果显示:(1)多聚赖氨酸能显著提高成纤维细胞对HYA的黏附;(2)HYA可被戊二醛交联而降低生物降解性;(3)修饰过的HYA经体内和体外实验证实具有很高的生物组织相容性,是一种具有很大工业化应用潜力的新型生物复合材料。

用多肽化表面处理法改进成纤维素对透明质酸之黏附性

发明领域

5 本发明涉及次高分子作表面处理之化学过程。本发明特别涉及以多肽
高分子作表面处理以改进透明质酸（Hyaluronan:HyA）与成纤维细胞之黏
附以增进 HyA 与细胞体之互容性。

发明背景

10 透明质酸(HyA)作为一种外在的介质（Matfix Component）可增进生
物质素之增长及黏附，但因其有水溶之特性，在应用上有其困难及限制。

透明质酸是一种高分子量的多糖，由左旋葡萄糖醛和 N-乙烯-左旋葡
萄糖胺构成的双糖单位反复重复所组成的多糖链。作为介质的一种，它存
15 在于所有的生物结缔组织中。除了具有已知的支撑和维持组织或器官的形
态学特性以外，透明质酸（HyA）还在最近被发现具有促进细胞定向移动
和增殖的功能。这些特点使 HyA 在生化形态工程之广泛使用中起重要作用。
目前发现，HyA 是通过三种称为 CD44、RHAMM、和 ICAM-1 的细
胞表面粘附分子受体来发挥上述作用的。除了通过细胞表面受体，HyA 还
20 通过细胞内 HyA 结合蛋白来调节细胞行为。由于纯化的了 HyA 的之特性，
目前正有广泛的研究为了更能利用 HyA 潜在的多种功能。此外，纯化的
HyA 在室温下是水溶性的，如何使 HyA 不溶于水而减低它的快速水解，
是外科、药剂和许多工业产品的需要，这就要对 HyA 进行化学交联。虽
然目前已对 HyA 的交联方法进行了许多尝试，但仍处于探索阶段。

25 因此对 HyA 在化学特性上仍有更进一步改进其功能之必要，以更增
进其生化之共容性，以致能在工业及生化产品产生更高之效能。

发明概述

本发明之特点在于使用以表面处理之方法，来增进透明质酸 HyA 对生物素质之相容性 (Bio-Compatibility) 及附着性，以增加及加强其在工业、生化产品及生化组织后殖之功效。

5 发明详述

本发明以表面处理加强透明质酸 (HyA) 之细胞粘附性，以增进其生化特性扩大其使用范围及功用。在表面处过程中本发明以戊二醛交联 HyA 条索，再以下列方法处理。

10 戊二醛 (Glut) 是一种在电镜、蛋白质化学和免疫组织化学中广泛应用的传统交联剂。作为用于生物材料交联最为广泛的一种交联剂，戊二醛还被用于稳定异体组织移植物，强化组织修复物，如心脏瓣膜、血管、韧带的移植。虽然对使用戊二醛进行生物材料的交联存有细胞毒性的顾虑，但是当观察到戊二醛交联过的心包在移植后不出现钙化和挛缩时，短时戊
15 二醛处理的自体器官 (组织) 移植物又再度成为生化研究的重要对象。新近研究发明，细胞表面粘附分子受体与某种多肽生长因子和细胞分裂因子相关的机制。如多聚赖氨酸等正电荷涂层材料，通常涂布于塑料和玻璃器皿的表面，以改善细胞的粘附性，供体外研究使用。本发明利用多聚赖氨酸之特性对移植物的直接涂层作处理。本发明先用戊二醛交联 HyA 条索
20 (Strands)，然后用四种不同的氨基酸和多肽进行表面涂层处理。在涂层 (coating) 表面种植成纤维细胞后，并用组织学和免疫组织化学染色方法检测评估、经化学修饰的 HyA 条索对成纤维细胞的附着和生长情况。同时探讨某些生物学特性。

25 本发明特以下列实施例来更详细说明：

例一：HyA 条索的制备

(1) 钠-透明质酸的离子交换

将 0.15 克的透明质酸钠注入经高压蒸汽灭菌的透析管中，往阳离子交换树脂透析后，用无菌水漂洗样品。然后液化的 HyA 转移致 DMSO。
30 再经两天搅拌后，将 HyA 抽入 10 毫升的注射器中。

(2)HyA 条索的制备和交联

用 25gaugt(0.5mm)的注射针头连接于吸有经去离子处理的 HyA 的 10ml 注射器, 然后将 HyA 推注入盛有 100%酒精的烧杯中形成条索, 4℃ 下保存过夜。将 HyA 条索置于 5mm 的滤纸上, 空气中晾干。将实验组样品浸生物学级的戊二醛溶液中, 其浓度分别为: 0.5%、5%、25%、和 50%, 在 4℃下保存 1、2、4、8、12、24、48、72 小时。用蒸馏水浸洗后, 将 HyA 条索置于 PBS 液中透析 48 小时, 以减少残留的戊二醛, 然后置于 PBS 液中过夜保存。

例二: 用氨基酸和多肽进行表面处理

制备新鲜的 10%右旋谷氨酸, 1%甘氨酸 5mg/1ml 浓度的多聚左旋赖氨酸, 和 10mg/ml 浓度的多聚左旋赖氨酸溶液。将 HyA 条索浸于四种溶液中的一种 1 小时。经表面处理后, 用蒸馏水漂洗备用。

例三: 接种成纤维细胞于 HyA 条索表面

取生长相的成纤维细胞 (大约分裂 3 天的细胞), 用蛋白酶处理 15 分钟, 形成悬浮液。2000 转/分离心 10 分钟后, 移去上清液, 加入 DMEM, 再将细胞悬浮起来。此时每立方厘米约有 5 个细胞 $4-6 \times 10^4$ 。用带有无菌平头针的注射器吸取和推注细胞培养液 3-5 遍, 使细胞均匀地悬浮。将成纤维细胞轻缓地注入盛有 HyA 条索的培养皿中。接着注入 1ml 培养液。将接种了细胞的 HyA 条索在温箱内 37℃温育, 并每隔 24 小时用倒置显微镜观察一次, 连续 7 天, 然后分为两个实验组, 一组继续体积培养保存, 另一组准备植入活体组织内。

例四: 接种成纤维细胞的 HyA 条索的移植

将实验生物用 4%氯仿麻醉。采用 NIH 的实验动物的使用和护理标准进行观察。取 4 段 (每段 2 厘米长) 成纤维细胞接种的 HyA 条索, 植入实验生物右侧胸部皮下, 切口用 4 号尼龙线缝合。

例五：样品的采集和准备

2-4 周后，取出生物样品固定于甲醛缓冲固定液中 2 小时。常规处理样品：石蜡包埋，做成 10mm 段的切片。然后将切片脱蜡、脱水备用。用 PBS 缓冲液浸洗培养器皿中的样品 30 分钟，在 10% 的中性
5 甲醛液中固定 1 小时。然后再用 PBS 浸洗 30 分钟备用。

例六：免疫组织化学染色

用 0.3% 的双氧水浸泡 30 分钟，用 PBS 液漂洗。然后用马血清封闭样品 30 分钟。接着用 1: 200 稀释的 PCNA 抗体浸育过夜。用生物
10 素复合试剂盒处理样品，用 DAB 显色，然后封片。其他样品用溴酚蓝或 HE 染色。用 Baxter 细胞计数仪点数 1 厘米范围内的 HyA 条索上的细胞数量。生长中的细胞被 PCNA 阳性染色所标记。采用从“O”到“++++”（O=阴性结果，+=1-25%；++=26-50%；+++ =51-75%；++++=76-100%）的分级法进行阴阳性着色比例的评估。
15

实例之结果采用 50% 的戊二醛 72 小时交联的 HyA 条索与其它低浓度短时间浸育组相比，前者具有更好的稳定性且不溶于水。在浸泡于 PBS 液或蒸馏水 2 天后仍可以保持它们的形状，甚至超过 3 个月。用低浓度（如 25%）戊二醛交联组，其条索在 PBS 液中 5 分钟到 12
20 小时相继溶解。而所有低于 25% 的浓度进行交联的条索在 PBS 液或蒸馏水中立即溶解。

虽然 50% 戊二醛交联的 HyA 条索相当稳定，但是所种植的成分纤维细胞不能贴附于条索表面。经多聚赖氨酸进行表面处理后，HyA 条索
25 表面粘附细胞的能力明显增强，特别是用左旋多聚赖氨酸，而右旋谷氨酸和甘氨酸涂层并不能促进细胞的贴附。多聚左旋赖氨酸促进细胞贴附的效果最明显，每厘米的 HyA 条索表面附着有 50-100 个细胞；其次是多聚右旋赖氨酸，每厘米有 40-80 个细胞。同时，两种多聚赖氨酸均可使细胞在 HyA 条索表面生长至少一个月。用 PCNA 染色法处理
30 条索上的成分纤维细胞呈阳性结果[（表 1）粘附和生长于四种不同氨基

酸或多肽之一进行表面处理的 HyA 条索的细胞的比较],着色强度略低于在培养皿底部生长的细胞。粘附在多聚赖氨酸涂层的 HyA 条索表面的细胞的生长状况要明显地优于其它组。PCNA 主要着色于核仁,而其它染色则着色于细胞质。

5

经戊二醛交联并种植了细胞的 HyA 条索的组织相容性已经为体外和体内实验所证实。在体内,在大鼠活体组织中种植 4 周后,未见有明显炎症和坏死反应。光镜下观察,HyA 条索仍然保持着植入时的形状,细胞沿着条索生长良好。PCNA 染色显示,细胞在用多聚左旋赖氨酸和多聚右旋赖氨酸进行表面处理的 HyA 条索表面增殖活跃,其等级为“++”。在移植物周围有结缔组织浸润,但未见有炎细胞、巨噬细胞或淋巴细胞在局部聚集。

10

作为一种细胞外介质,HyA 除了具有粘性和压力阻抗及缓冲腔的作用外,最近更发现它与组织的特性。多数自然的和化学合成的 HyA 仅仅以液体或膏状剂型或混入细胞培养液用于体外或注射入体内进行研究观察。由于 HyA 在室温下的水溶性,使其应用受到很大的限制,通常仅用于液态内容物空腔充填的临床治疗,如作为玻璃体的替代物,或用于滑膜腔中等空腔。而用为软组织的替代物则不易使用。

15

20

在发明形成一种固体或半固体的 HyA,在经交联后不溶于水,可更方便使用。

25

30

戊二醛是一种广泛地应用于生化材料交联的试剂。本发明以增加戊二醛的浓度增加胶原 HgA 非水溶性。经在 50%的戊二醛液中浸育 72 小时后,HyA 条索的形态学性质相当稳定。而低浓度或短时间的浸育,则极易溶于 PBS 液或水。为了避免戊二醛对细胞的毒性作用,经戊二醛交联的 HyA 条索需要在 PBS 液中透析和漂洗。实验观察到成纤维细胞沿着经 50%戊二醛交联的 HyA 条索良好地生长,并且 HyA 条索被成功地种植在生物体内而无炎症和坏死反应。这表明,所有的或大多数

的残留戊二醛经透析和漂洗已经除去，任何残留的醛基将会导致活细胞和组织的损伤。

5 本发明首先用高浓度的戊二醛交联 HyA 条索，然后再以多聚赖氨酸进行表面处理，达到加固交联效果的作用。因此，用多聚赖氨酸进行表面处理，不仅可以增强材料的组织相容性和促进细胞对材料的粘附，它还可以经进一步对材料的交联，而加固交联，减缓材料在移植组织中的降解。

10 本发明成功的使用表面处理的技术改良了 HyA 的功能及特性，也根据多聚赖氨酸增强蛋白激酶之协调及转导过程的特性并利用多聚赖氨酸涂层特性之优点，增强 HyA 之黏附性。多聚赖氨酸又能刺激蛋白激酶 CK2 的活性。因此多聚赖氨酸本身或/和 HyA 通过细胞内的信号转导调节激活，甚至是可能通过分裂基因蛋白活化激酶来调节细胞的
15 活性，包括细胞的黏附性和增殖。

多聚赖氨酸亦具有交联功能，与某些型成相对较弱的羟基和羟基键交联剂不同的是，左旋速氨酸或左旋甲基赖氨酸酯交联 HyA，形成的是很强的氨基键。这种键比 Schiff-base 键更能对抗水解。

20 故此本发明经多聚赖氨酸表面处理的 HyA 条索极为大地增强了细胞对 HyA 表面的黏附，而且促进了细胞的增殖。左旋多聚赖氨酸的效果更优于右旋赖氨酸。本发明也使用了 HyA 材料和多聚赖氨酸之间的作用机制，经修饰的 HyA 条索可以使用在自体现或异体移植，并作
25 携载药物的有价值的物生物材料。对不同的细胞系，HyA 及胶原介质都能达成黏附及抗溶的优良特性。

权利要求书

1. 一种透明质酸，其特征为：
5 含戊二醛而交联成条索状；
含多聚赖氨酸；及
含成纤维细胞并具表面层之黏附性。
2. 根据权利要求 1 之透明质酸，还含有谷氨酸表面处理剂。
- 10 3. 一种透明质酸，其特征为含有降溶剂。
4. 根据权利要求 3 之透明质酸，还含有表面处理剂。
- 15 5. 根据权利要求 4 之透明质酸，其中所述之表面处理剂为多肽表面
面处理剂。
6. 根据权利要求 4 之透明质酸，其中所述之多肽表面处理剂为多
聚赖氨酸。
- 20 7. 根据权利要求 3 之透明质酸，其中所述之透明质酸成一交联
状。
8. 根据权利要求 3 之透明质酸，其中所述之降溶剂为戊二醛。
- 25 9. 根据权利要求 5 之透明质酸，其中所述之多肽表面处理剂为多
聚赖氨酸。
10. 根据权利要求 5 之透明质酸，其中 所述之多肽表面处理剂为
30 甘氨酸。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N11/08 COSB37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N COSB

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI(hyaluronan/HyA/hyaluronic acid/fibroblast/glutaraldehyde/polylysine)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP-S333402	1-10
A	EP-0359996	1-10
A	WO94/01483	1-10
A	US-5080924	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28.Jul.2000(28.07.00)

Date of mailing of the international search report

20 AUG 2000 (20.08.00)

Name and mailing address of the ISA/S020, Beijing, 100088

Authorized officer

Facsimile No.86-10-62019451

Telephone No.86-10-62093933

Correction

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

Patent document	Publication	Patent family	Publication
cited in search report	date	member(s)	date
WO94/01483	94-01-20		
		US5446091 A	1995-08-29
		US5470911 A	1995-11-28
		US5475052 A	1995-12-12
		US5476666 A	1995-12-19
		JP8502082T T	1996-03-05
		US5510121 A	1996-04-23
		US5510418 A	1996-04-23
		US5527856 A	1996-06-18
		US5550188 A	1996-08-27
		US5565519 A	1996-10-15
		US5614587 A	1997-03-25
		AU677789 B	1997-05-08
		US5643464 A	1997-07-01
		US5744545 A	1998-04-28
		US5786421 A	1998-07-28
		US5800541 A	1998-09-01
		US5936035 A	1999-08-10
US-5080924	92-01-14		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

Patent document	Publication	Patent family	Publication
cited in search report	date	member(s)	date
JP-8333402	96-12-17		
EP-0359996	90-03-28	AU4001489	1990-02-22
		DK410889	1990-02-23
		FI893854	1990-02-23
		US4908404	1990-03-13
		CN1042162	1990-05-16
		JP2191629	1990-07-27
		AU618834	1992-01-09
		AT104318T	1994-04-15
		NO175006B	1994-05-09
		NO175006C	1994-08-17
		DE68914559D	1994-05-19
		DE68914559T	1994-10-27
WO94/01483	94-01-20	AU4662093 A	1994-01-31
		US5292802 A	1994-03-08
		US5308889 A	1994-05-03
		US5324775 A	1994-06-28
		US5328955 A	1994-07-12
		EP0648239 A	1995-04-19
		EPI9930916926	
		US5413791 A	1995-05-09

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN99/00174

A. 主题的分类

IPC⁷ C12N11/08 C08B37/08

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12N C08B

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI(hyaluronan/HyA/hyaluronic acid/fibroblast/glutaraldehyde/polylysine)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	JP-8333402	1-10
A	EP-0359996	1-10
A	WO94/01483	1-10
A	US-5080924	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

28.7 月 2000(28.07.00)

国际检索报告邮寄日期

20. 8月 2000(20.08.00)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员



电话号码: 86-10-62093933

改正页

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请，
PCT/CN99/00174

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
JP-8333402	96-12-17	无	
EP-0359996	90-03-28		
		AU4001489	1990-02-22
		DK410889	1990-02-23
		FI893854	1990-02-23
		US4908404	1990-03-13
		CN1042162	1990-05-16
		JP2191629	1990-07-27
		AU618834	1992-01-09
		AT104318T	1994-04-15
		NO175006B	1994-05-09
		NO175006C	1994-08-17
		DE68914559D	1994-05-19
		DE68914559T	1994-10-27
WO94/01483	94-01-20		
		AU4662093 A	1994-01-31
		US5292802 A	1994-03-08
		US5308889 A	1994-05-03
		US5324775 A	1994-06-28
		US5328955 A	1994-07-12
		EP0648239 A	1995-04-19
		EPI9930916926	
		US5413791 A	1995-05-09

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(1998 年 7 月)

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN99/00174

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO94/01483	94-01-20		
		US5446091 A	1995-08-29
		US5470911 A	1995-11-28
		US5475052 A	1995-12-12
		US5476666 A	1995-12-19
		JPS502082T T	1996-03-05
		US5510121 A	1996-04-23
		US5510418 A	1996-04-23
		US5527856 A	1996-06-18
		US5550188 A	1996-08-27
		US5565519 A	1996-10-15
		US5614587 A	1997-03-25
		AU677789 B	1997-05-08
		US5643464 A	1997-07-01
		US5744545 A	1998-04-28
		US5786421 A	1998-07-28
		US5800541 A	1998-09-01
		US5936035 A	1999-08-10
US-5080924	92-01-14	无	